

---

---

**A sinalização celular: um enfoque no papel do  
AMPC no mecanismo de ação do glucagon e  
epinefrina no fígado.**

---

---

MÁRCIA VARDANEGA PEICHER(UNINGÁ)<sup>1</sup>

**RESUMO**

Este artigo tem por objetivo destacar o mecanismo de sinalização celular do glucagon e da epinefrina no fígado, dando ênfase no papel do AMPc, como o segundo mensageiro mobilizado durante a ação destes hormônios como agentes estimuladores da produção hepática de glicose. Estudos demonstram detalhes das vias de sinalização destes hormônios, como a quantidade de AMPc sintetizada dentro da célula e a ação compartimentalizada do AMPc, em função de uma distribuição diferenciada (heterogênea) de enzimas como a proteína quinase A (PKA), fosfodiesterases (PDEs) e das próprias enzimas das vias da glicogenólise e glicólise. Recentemente tem-se atribuído um papel de mensageiro intertecidos para o AMPc extrapolando-se a idéia de sua ação exclusivamente intracelular. Há realmente um grande interesse em decifrar estes complexos mecanismos de sinalização celular, pois certamente são pontos estratégicos para ação eficiente e localizada de medicamentos.

**Palavras-chave:** Sinalização celular. CAMP. Fígado.

**INTRODUÇÃO**

O mecanismo de comunicação entre células parece ter sido fator fundamental para a evolução dos seres multicelulares. Isto pode ser justificado quando observamos a morte de um organismo multicelular, provocada por um câncer resultante de uma falha no “controle social” da

---

<sup>1</sup> Professor Mestre Faculdade Ingá – UNINGÁ

divisão celular. Adicionalmente, é através destas “influências vizinhas” que células pluripotentes embrionárias (células tronco), inseridas num tecido já diferenciado, podem se diferenciar e se transformar em células iguais às deste tecido.

Além da capacidade de comunicação entre elas, as células também desenvolveram mecanismos intracelulares complexos para responder à presença dos sinais externos, provenientes de outras regiões do organismo. Estes sistemas incluem proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática e no interior da célula, proteínas quinase, proteínas fosfatase, proteínas ligadas ao GTP (proteína G), segundo mensageiros intracelulares e mais um conjunto de proteínas intracelulares com os quais estes “agentes sinalizadores” se interagem.

Através destes mecanismos de comunicação entre células, foi possível desenvolver tecidos com funções específicas onde a contribuição funcional de cada um, garante a sobrevivência do “todo”. Como exemplo, podemos colocar aqui o papel fundamental do tecido hepático na manutenção da oferta sanguínea de substâncias combustíveis para os tecidos extra-hepáticos, principalmente no que se refere a oferta de glicose sanguínea para o tecido nervoso, cuja capacidade de obtenção de energia se limita basicamente ao metabolismo da glicose (CRYER, 1985).

De maneira muito eficiente, os tecidos corporais (sob regulação do sistema nervoso e endócrino) trabalham de maneira integrada para manter uma disponibilidade constante destes combustíveis, utilizando-se dos sistemas de sinalização entre eles. Os hormônios insulina, glucagon e epinefrina, são substâncias mensageiras que, vindas de locais distantes pela corrente sanguínea, ajustam rapidamente a capacidade do fígado de produzir glicose em condições extremas como por exemplo: no período pós-refeição, onde a insulina converte o metabolismo hepático para o estado anabólico, e também no período de jejum, quando o glucagon, auxiliado pela epinefrina, rapidamente modifica a atividade metabólica hepática de anabólica para catabólica.

Este artigo visa apresentar somente algumas discussões sobre os mecanismos de sinalização hepática desencadeadas pelo glucagon, e de uma substância de ação semelhante à da adrenalina, o isoproterenol (um agonista  $\beta$ -adrenérgico), a partir de dados obtidos em experimentos de perfusão de fígado de ratos *in situ*.

Proteínas receptoras de membrana para o glucagon foram identificadas em muitos tecidos como o fígado, cérebro, pâncreas, rins,

intestino e tecido adiposo (JIANG; ZHANG, 2003). O glucagon é liberado na corrente sanguínea quando a glicemia diminui, pois seu principal papel fisiológico é estimular a produção hepática de glicose, o que promove a elevação da glicemia. Em concordância com seu papel de hormônio contrarregulador da insulina, o glucagon provoca elevação da produção hepática de glicose, em resposta a uma hipoglicemia induzida por insulina (LOPES et al. 1998).

A fixação da molécula de glucagon no seu receptor específico de membrana, leva a uma alteração conformacional deste receptor, ativando subseqüentemente a proteína G acoplada. Pelo menos duas classes de proteína G são conhecidas por estarem associadas e envolvidas na transdução do sinal do receptor do glucagon, denominadas de  $G_{s\alpha}$  e  $G_q$ . A  $G_{s\alpha}$  ativa a enzima adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis intracelulares do segundo mensageiro adenosina mono fosfato cíclico (AMPC), com subseqüente ativação da proteína quinase A (PKA). A  $G_q$  ativa a fosfolipase C (PLC), aumentando os níveis intracelulares do segundo mensageiro inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e subseqüente liberação de cálcio dos estoques intracelulares (retículo endoplasmático) (JIANG; ZHANG, 2003).

O efeito mais visível do glucagon no fígado é a ativação da glicogenólise, dada através da PKA que, uma vez mobilizada, fosforila e por isso ativa uma enzima denominada glicogênio fosforilase quinase. Esta, por sua vez, fosforila ativando uma outra enzima, a glicogênio fosforilase, que tem como função degradar glicogênio liberando moléculas de glicose-6-fosfato (G6P) e, subseqüentemente, liberação de glicose no sangue pelo fígado.

Paralelamente, o glucagon diminui a síntese de glicogênio (glicogênese). A PKA ativada promove uma fosforilação, que leva a inativação de uma enzima denominada glicogênio sintase, responsável pela síntese de glicogênio. A inativação da glicogênio sintase, portanto, reduz o acúmulo de glicogênio no hepatócito.

Em adição ao efeito sobre o metabolismo do glicogênio, o glucagon regula a glicemia por interferir no metabolismo da glicose, especialmente por estimular a gliconeogênese e inibir a glicólise. O glucagon, através da mobilização da PKA, aumenta a síntese da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que cataliza uma reação importante da via neoglicogênica hepática. Através da PKA, o glucagon também induz a conversão da frutose-2,6-bifosfato (F2,6BP) em frutose-6-fosfato (F6P). A F2,6BP é um inibidor potente da enzima frutose

bifosfatase-1 (FBPase-1) e ativador da enzima frutose fosfoquinase-1 (FPK-1). Assim, a redução dos seus níveis intracelulares, favorece bastante a via gliconeogênica ao mesmo tempo que inibe a glicólise, já que a atividade destas enzimas é compartilhada pelas duas vias. A PKA também fosforila a enzima que catalisa o último passo da via glicolítica, a piruvato quinase (PK). Quando fosforilada, a PK fica inativada, o que favorece ainda mais a redução da glicólise.

A epinefrina é um hormônio que também exerce efeito sobre o metabolismo de glicose no fígado (VARDANEGA-PEICHER et al; 2000). Ao se ligar nos receptores adrenérgicos hepáticos, a epinefrina promove a liberação da subunidade  $G_s\alpha$  da proteína G, promovendo a ativação da enzima AC de membrana, levando a formação do segundo mensageiro intracelular AMPc. Na presença de AMPc, a PKA torna-se ativada levando a fosforilação e ativação da glicogênio fosforilase quinase que por sua vez, fosforila e ativa a enzima glicogênio fosforilase iniciando a degradação do glicogênio, e assim, aumentando a capacidade do fígado de produzir glicose. O aumento da oferta intracelular de glicose-6-fosfato, estimula a glicólise (por aumento da oferta de substrato), o que seria um efeito excitatório indireto da epinefrina sobre esta via, se contrapondo ao efeito inibitório promovido pelo glucagon.

Assim, a glicólise no fígado parece ser regulada de maneira oposta por agentes que aumentam o AMPc intracelular, isto é, epinefrina (através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) e glucagon que estimula e inibe a glicólise respectivamente. Pelo fato de o glucagon e o isoproterenol (um agonista  $\beta$ -adrenérgico) mobilizarem a formação do mesmo segundo mensageiro, o AMPc, a quantidade de AMPc mobilizada por cada um, poderia ser o fator responsável por seus efeitos opostos na glicólise hepática. Para testar esta hipótese, realizamos estudos em fígados de ratos perfundidos com concentrações diferentes de AMPc Vardanega Peicher et al. (2003), que simulassem os efeitos obtidos pelo glucagon e pelo isoproterenol na glicólise e glicogenólise hepática, em condições de normoglicemia (LOPES et al. 1998). Neste artigo, tivemos como objetivo investigar se o efeito antagônico observado sobre a glicólise hepática, na presença de isoproterenol ou de glucagon, fosse resultante de uma quantidade diferente de AMPc mobilizada por cada um destes agentes.

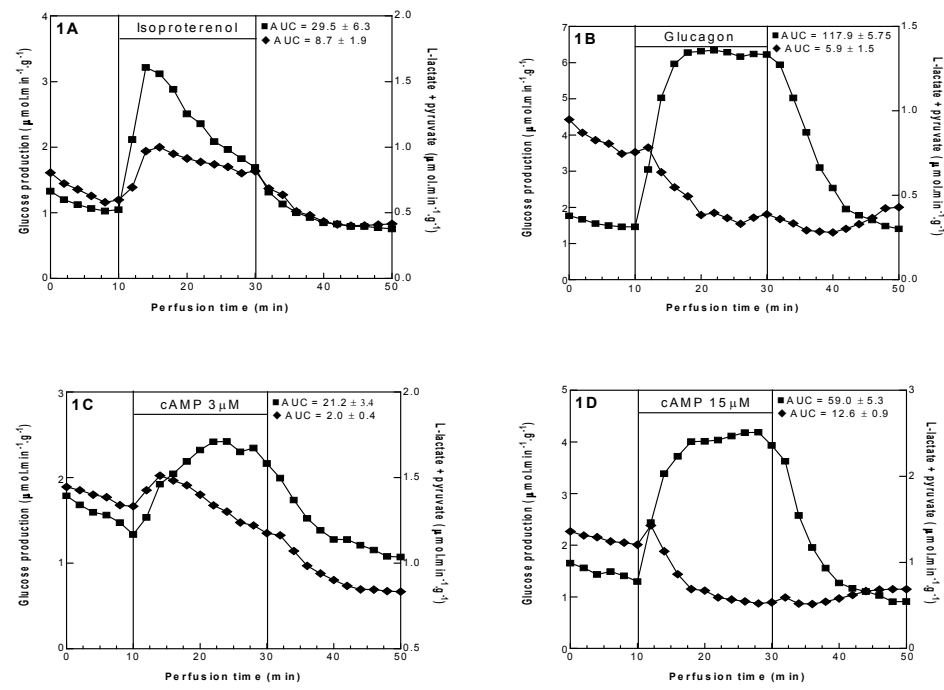


Fig. 1. Efeito do isoproterenol 20µM (A), glucagon 1nM (B), AMPc 3µM (C) e AMPc 15µM (D) na glicogenólise (linha com quadrados) e glicólise (linha com losangos) a partir de experimentos de perfusão de fígado de ratos *in situ*. AUC = área sob a curva. Os dados representam a média de 4 a 8 experimentos de perfusão individuais. Os dados da glicogenólise foram obtidos a partir da soma da produção hepática de glicose mais a soma da produção hepática de L-lactato+piruvato (glicólise)/2. Figura extraída do artigo de VARDANEGA-PEICHER et al. 2003.

Na Fig.1 os gráficos mostram que a infusão de 15µM de AMPc (1D) no fígado, promove uma ativação da glicogenólise e inibição da glicólise com padrões qualitativos e quantitativos muito semelhantes aos observados pela ação do glucagon (1B). Já na infusão de 3 µM de AMPc (1C) o fígado apresentou um aumento tanto na glicólise quanto na glicogenólise inclusive com padrões qualitativos e quantitativos semelhantes aos efeitos do isoproterenol (1A) sobre estas vias. Em 1997, Houslay e Milligan já haviam sugerido que as fosfodiesterases (PDEs), enzimas que degradam o AMPc intracelular, ficariam ancoradas e distribuídas no citosol, criando gradientes localizados de AMPc, o que permite respostas diferentes para glicólise e glicogenólise. Quantidades superiores de AMPc poderiam ser suficientes para sobrepor a ação das

PDEs e penetrar no citosol, criando um gradiente favorável para a inibição das enzimas de glicólise.

Nossos dados parecem estar em concordância com a proposta de Housley; Milligan (1997), e sugerem também uma distribuição compartimentalizada das enzimas da glicogenólise e da glicólise, pois os efeitos sobre a glicogenólise qualitativamente foram maiores que os efeitos sobre a glicólise, tanto por ação dos agentes glucagon/isoproterenol, quanto pela ação das concentrações de 15 e 3  $\mu$ M de AMPc.

Se a glicogenólise é assim mais sensível à presença de AMPc, é possível que as enzimas desta via sejam distribuídas em áreas mais periféricas do citosol onde seriam rapidamente influenciadas pelo AMPc vindo de fora da célula (AMPc perfundido a 3 e 15  $\mu$ M), ou originado pela estimulação da AC (glucagon). Já as enzimas da via glicolítica, poderiam estar distribuídas em áreas mais centrais do hepatócito, onde somente concentrações maiores de AMPc poderiam conseguir promover o efeito inibitório sobre esta via.

Henn et al. (2005) também relatou uma ação compartimentalizada do AMPc provocada pela distribuição das proteínas ancoradoras de proteínas quinases A (AKAPs) e fosfodiesterases no citosol, inclusive no mecanismo de reabsorção de água pelas células renais mediada pela vasopressina. Nos últimos anos, a ciência tem desfrutado de novas técnicas baseadas na proteína verde fluorescente e no FRET (fluorescence resonance energy transfer), que oferecem imagens em tempo real de biossensores fluorescentes demonstrando a dinâmica do AMPc diretamente como ele ocorre dentro de células intactas e vivas, o que nos permite uma visualização da via de sinalização do AMPc/PKA (ZACCOLO et al. 2005). Com isso, muito se tem aprendido sobre os mecanismos de sinalização celular, como por exemplo, sabe-se que muitas substâncias exercem seus efeitos celulares ativando receptores que compartilham pelo menos os primeiros passos da via de sinalização, bem como substâncias que acionam vias metabólicas específicas dentro das células, o que revela o alto grau de organização da comunicação celular.

De acordo com o artigo de revisão de Bankir et al 2002, parece estar bem estabelecido que o glucagon, além de promover acúmulo de AMPc intracelular, também induz liberação hepática de AMPc no sangue. Inclusive, segundo artigo, o glucagon teria efeitos natriuréticos e fosfatúricos através da inibição da reabsorção de sódio e fosfato nos túbulos proximais do néfron mediados por este AMPc extracelular, indicando a existência de uma cascata pancreato-hepato-renal. Isso

levanta a idéia de que o AMPc, um conhecido segundo mensageiro intracelular, também exerceria um papel de “primeiro mensageiro”, ou seja, poderia estar envolvido em sistemas de comunicação entre tecidos, assim como os hormônios, embora ainda não se tenha identificado receptores de AMPc em tecidos de mamíferos.

Enfim, se considerarmos que o sítio de ação de muitos medicamentos é exatamente num destes passos das vias de sinalização intra e intercelular, temos aqui uma área da pesquisa científica merecedora de incentivo em todos os aspectos, pois, os dados acumulados nos revelam não somente os passos lentos da nossa eterna evolução, mas hoje, principalmente, nos permitem interferir nestes passos com agentes que podem melhorar a qualidade de vida de pessoas que sofrem de doenças provocadas por desordens nestes mecanismos de sinalização.

### REFERÊNCIAS

BANKIR, L. et al. Extracellular camp inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved? *Am. J. Physiol.* 282, F376-p.392, 2002.

CRYER, P.E. Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: FOSTER, D. W. and WILSON, J. D. (eds). **Williams Textbook of endocrinology**. Washington: W. B. Saunders, 1985. p. 989-1016.

HENN, V. et al. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1316-1318, 2005.

HOUSLAY, M.D.; MILLIGAN, G. Tailoring cAMP-signaling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* 22, 217-224, 1997.

JIANG, G.; ZHANG, B.B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, 671- 678, 2003.

LOPES, G. et al. The responsiveness of glycogen catabolism to adrenergic agonists during insulin-induced hypoglycemia (IHH) in rat livers. *Gen. Pharmac.* 30 593-599, 1998.

VARDANEGA-PEICHER, M. et al. Time sequence of changes in the responsiveness of glycogen breakdown to adrenergic agonists in perfused

liver of rats with insulin-induced hypoglycemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 805-813, 2000.

VARDANEGA-PEICHER M. et al. Comparative effect of glucagon and isoproterenol on hepatic glycogenolysis and glycolysis in isolated perfused liver. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 46, 563-568, 2003.

ZACCOLO, M. et al. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1323-1326, 2005.